

氏名	はるた まさゆき 春 田 雅 之
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	甲第47号
学位授与年月日	平成17年 3月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Narrowed abrogation of the Angelman syndrome critical interval on human chromosome 15 does not interfere with epigenotype maintenance in somatic cells (Angelman syndrome 患者で認められるヒト15番染色体上の微小欠失領域の欠失は体細胞におけるエピジェノタイプの維持を阻害しない)
学位論文審査委員	(主査) 佐藤 建三 (副査) 押村 光雄 島 義郎

学位論文の内容の要旨

ヒト15番染色体q11-q13領域は多くの刷り込み遺伝子がクラスターを形成して存在する刷り込みドメインであり、この領域の刷り込み遺伝子の発現異常により発症する刷り込み関連疾患 Prader-Willi/Angelman 症候群 (PWS/AS) の責任遺伝子座である。15q11-q13 領域内には父親型、母親型エピジェノタイプを規定する IC (インプリンティングセンター) の存在が示唆されている。PWS IC の機能は家系解析やノックアウトマウスにより、精子形成過程における母親型から父親型への刷り込みの書き換え、および *de novo* での刷り込みの維持に関与する。一方、AS IC はマウスにおいてそのホモログが同定されていないため機能解析が進んでおらず、PWS IC 同様 *de novo* での刷り込みの維持に関与するかは答えを得ていない。本研究では、AS IC の機能解析を目的とし、DT40 cell shuttle system を用い AS-SRO の改変を行い、AS-SRO の欠失がヒト15番染色体q11-q13 刷り込みドメインに与える影響を遺伝子発現と DNA のメチル化によって解析した。

方法

AS-SRO をノックアウトするため、微小核細胞融合法により A9 雑種細胞中の父方、母方ヒト15番染色体をそれぞれ、ニワトリプレ B 細胞株 DT40 細胞に移入し、AS-SRO を薬剤耐性遺伝子 *puro* に置換した。以前の当研究室の解析から DT40 細胞ではヒト刷り込み遺伝子発現が維持されていなかったことから、ヒト刷り込み遺伝子発現が維持されることが明らかなチャイニーズハ

ムスターCHO 細胞で刷り込み状態を解析するため、微小核細胞融合法により父方、母方ヒト 15 番染色体、および父方、母方改変ヒト 15 番染色体をそれぞれ CHO 細胞に移入した。父方、母方ヒト 15 番染色体、および、父方、母方改変ヒト 15 番染色体を保持する CHO 細胞、それぞれから RNA および DNA 抽出を行った。発現様式は RNA から cDNA を合成し、RT-PCR により確認した。また、メチル化解析は SNRPN プロモーター領域を対象とし、DNA をメチル化感受性制限酵素により消化後、サザンブロッティング法で確認した。

結 果

父方、母方ヒト 15 番染色体を保持する CHO 細胞をそれぞれ 2 クローン、父方、母方改変ヒト 15 番染色体を保持する CHO 細胞それぞれ 5 クローンを解析に用いた。ヒト 15 番染色体 q11-q13 に存在する父性発現の刷り込み遺伝子 NDN、SNRPN、IPW は父方ヒト 15 番染色体、改変ヒト 15 番染色体を保持する CHO 細胞からのみの発現を認めた。一方、母性発現の刷り込み遺伝子 ATP10C、UBE3A は全てのクローンからの発現を認めた。これは、ATP10C、UBE3A が脳組織特異的に母性発現を呈する遺伝子であり、マウス A9 雑種細胞中において両アリル発現を呈することと一致した。また、SNRPN プロモーター領域は父方ヒト 15 番染色体、改変ヒト 15 番染色体ではメチル化しておらず、母方ヒト 15 番染色体、改変ヒト 15 番染色体においてメチル化を認めた。

考 察

刷り込み変異が認められる PWS、AS 患者における解析により PWS・AS それぞれに共通微小欠失領域が見いだされ、それぞれの領域内に 15q11-q13 領域のエピジェノタイプを cis に規定する IC の存在が示唆されている。近年、PWS IC・AS IC の機能解析が進められているが、AS IC が PWS IC 同様 *de novo* での刷り込みの維持に関与するかは答えを得ていない。本研究では、DT40 cell shuttle system を用いて AS-SRO のノックアウトを行い、この刷り込みドメインへの影響を解析した。AS-SRO 欠失 CHO 細胞ではヒト 15 番染色体 q11-q13 刷り込みドメインの遺伝子発現および DNA メチル化ともに正常に維持されており、AS-SRO 欠失はこの領域のエピジェノタイプに影響を与えないことを確認した。このことより、AS IC は PWS IC とは異なり *de novo* での刷り込みの維持に関与しないと考えられる。よって、AS-SRO 欠失をもつ AS 患者は母親の卵子形成過程に於いて、この刷り込みドメインの父親型から母親型への刷り込みの書き換えが生じず父親型のまま伝わったと考えられた。このように、DT40 cell shuttle system はヒトの発現制御機構におけるシス配列の解析に有用である。

マウスでは、*Snrpn* 上流から転写される *Ube3a antisense transcript* による *Ube3a* の脳組織特異的な母性発現制御の可能性が示唆されている。DT40 cell shuttle system と神経発生の培養モデルを用いればヒトにおいてもこの発現制御メカニズムが働くかを調べることができ、この領域の刷り込み遺伝子発現制御機構の解明が進むものと期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は AS IC の機能解析を目的とし、DT40 cell shuttle system を用い Angelman syndrome 患者で欠失が認められる AS-SRO のノックアウトを行い、AS-SRO の欠失がヒト 15 番染色体 q11-q13 刷り込みドメインに与える影響を遺伝子発現と DNA のメチル化によって解析したものである。その結果、AS-SRO 欠失 CHO 細胞ではヒト 15 番染色体 q11-q13 刷り込みドメインの遺伝子発現および DNA メチル化ともに正常に維持されており、AS-SRO 欠失はこの領域のエピジェノタイプに影響を与えないことを明らかにした。本論文の内容は、様々な疾患との関わりが注目される epigenetics の分野で、AS IC が PWS IC とは異なり *de novo* での刷り込みの維持に関与しないことを示唆するものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。